

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie,
Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce)
und dem Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. Volkmar Schneider)

Insulinbestimmung im Leichenblut

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alfred Hoffmann

aus Obersalbach

1904

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce)
und dem Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. med. Volkmar Schneider)

Insulinbestimmung im Leichenblut

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alfred Hoffmann
aus Obersalbach

Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce

Korreferent: Prof. Dr. H.-J. Quabbe

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14. 8. 1984

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	5
B. Fragestellung	8
C. Methodik	
I. Prinzip und Durchführung der Insulinbestimmung nach dem RIA-Verfahren	9
II. Hb-, Protein- und pH-Bestimmung	11
III. Statistische Überprüfung der Insulinbestimmung	11
D. Versuchsanordnung	
I. In-vitro-Ansätze zur Überprüfung von Einflüssen auf die Insulinbestimmung	
1. Hämolysegrad	13
2. Hemmstoffzusätze	14
3. pH des Ansatzes	14
4. Proteingehalt des Ansatzes	15
5. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe	16
II. Ansatz mit Leichenblut	
1. Insulingehalt ohne und mit Hemmstoffzusatz	17
2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes	18
E. Ergebnisse	
I. Statistische Überprüfung der Insulinbestimmung	19
II. In-vitro-Versuche zur Überprüfung der Einflüsse auf die Insulinbestimmung	
1. Hämolysegrad	21
2. Hemmstoffzusätze	22
3. pH des Ansatzes	23
4. Proteingehalt des Ansatzes	24
5. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe	25

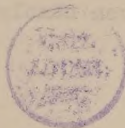
	Seite
III. Insulinbestimmung im Leichenblut	
1. Insulingehalt ohne und mit Hemmstoffzusatz	25
2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes	30
F. Diskussion	
I. Einflußfaktoren	
1. Hämolysegrad	31
2. Hemmstoffzusätze	31
3. pH-Wert	33
4. Proteingehalt	33
II. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe	34
III. Insulinwerte im Leichenblut	
1. Literaturwerte	35
2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes	35
3. Postmortale Proteolysevorgänge	36
4. Empfehlung für die Insulinbestimmung im Leichenblut und -gewebe und die Beurtei- lung der Meßwerte	37
G. Zusammenfassung	39
H. Literatur	41
I. Lebenslauf	44

A. Einleitung

Wer heute das Wort "Insulin" hört, denkt zuerst an die segensreiche Wirkung dieses Proteohormons bei Diabetikern. Aber Insulin kann auch zum tödlichen Gift werden, wenn es in zu hohen Konzentrationen verabreicht wird. Die Todesursachenstatistik (" Handbuch der Internationalen Klassifikation der Krankheiten, Verletzungen und Todesursachen (ICD) 1979, 9. Revision) zeigt in den Jahren 1979-1982 für Berlin und die Bundesrepublik Deutschland folgendes Bild:

<u>Pharmaka</u>		<u>Todesfälle</u>			
		1979	1980	1981	1982
Irsulin	Berlin	1	ø	1	3
und anti-					
diabeti-	Bundes-				
sche Phar-	republik	21	13	24	ø Angaben
maka					

Dem stehen jährlich etwa 5000 Vergiftungsfälle mit anderen Pharmaka gegenüber. Im Vergleich zu den Barbituraten beispielsweise nimmt das Insulin in der Statistik zwar einen bescheidenen Platz als Vergiftungssubstanz ein, wir wissen aber, daß die Gerichtsmediziner in weit mehr Fällen Insulin als Todesursache vermuten, als sie es beweisen können. Laut Auskunft des Instituts für Rechtsmedizin in Berlin ließe sich die in der Statistik ausgewiesene Zahl



an Insulintoten in etwa verdoppeln, wenn man diejenigen Toten hinzuzähle, bei denen die näheren Todesumstände auf einen Insulintod hindeuten, er aber nicht bewiesen werden kann.

Dieser Tatbestand überrascht, da doch seit Jahren mit dem Radioimmunoassay (RIA) ein empfindlicher Nachweistest für Insulin zur Verfügung steht. Dieser Test ist jedoch zum Nachweis von Insulinkonzentrationen in postmortal gewonnenen Proben unzuverlässig. Lindquist und Rammer (14) berichten, daß sie in 29 Fällen von plötzlichem Tod im Femoralvenenblut Insulinkonzentrationen von 5 bis 60 mU/l maßen, während sie im Blut aus der rechten Herzkammer bis zu zehnfach höhere Werte fanden.

Es liegt nahe, die Ursache für dieses Phänomen pauschal in den postmortalen Autolyseprozessen zu vermuten. Ein wichtiger Teilvorgang der Autolyse ist die Eiweißzersetzung. Diese Proteolyse betrifft auch das Proteohormon Insulin. Aufgrund dieses Abbaues würde man folgerichtig bei der postmortalen Insulinbestimmung niedrigere Werte erwarten als beim Lebenden, und zwar umso deutlicher, je höher das Leichenalter läge. Damit wäre keine Erklärung für die zum Teil sehr hohen Insulinwerte im Blut von Leichen gefunden.

Weiterhin verdient die Überlegung Beachtung, ob nicht die im Rahmen der Autolyse auftretenden hämolytischen Prozesse die Insulinbestimmung im Leichenblut stören können. Dwenger und Trautschold (7) konnten nachweisen, daß die Wiederfindungsrate für Insulin nach Zusatz von Insulinstandards zum Serum deutlich über 100% lagen, wenn durch Zugabe von hämolytischem Blut bestimmte

Hb- Werte überschritten wurden. Sie machten für dieses Phänomen ein erythrozytäres Enzym verantwortlich, welches das markierte Insulin im Meßansatz abbaue, so daß Radioaktivität frei wird und nicht mehr mit dem Antikörper gefällt werden kann und damit falsch hohe Insulinkonzentrationen bei der Messung im Sediment vorgetäuscht werden. Mithilfe von N-Äthylmaleinimid gelang es ihnen dann, diesen Abbau zu hemmen und die Werte trotz Hämolyse in vitro den theoretischen Werten anzugleichen.

Gennaro und Norman (9) wiesen nach, daß auch der pH-Wert einen Einfluß auf die Antigen-Antikörper-Reaktion im Insulinansatz hat und somit bei der Insulinbestimmung berücksichtigt werden muß.

Unter diesen Gesichtspunkten sind Beurteilungen von Insulinwerten im Leichenblut, insbesondere die Entscheidung über einen Insulintod, nur dann vertretbar, wenn alle diese Unsicherheiten ausgeräumt werden können oder zumindest bekannt ist, welche Einflüsse beachtet und ausgeschaltet werden müssen. Hier den Weg zu bereiten, war das Ziel dieser Arbeit.

B. Fragestellung

Wir haben uns folgende Fragen vorgelegt:

- I. Welche Faktoren haben Einfluß auf die Insulinbestimmung im hämolysierten, insbesondere Leichenblut?
- II. Stimmen die Literaturangaben über den Insulingehalt im Blut von Leichen?
- III. Kann man die Meßmethode von Insulin soweit verbessern, daß sie im Leichenblut und-gewebe anwendbar ist und gerichtsmedizinische Aussagen über Insulintod möglich werden?

C. Methodik

I. Prinzip und Durchführung der Insulinbestimmung nach dem RIA- Verfahren

Die Bestimmung des Insulins nach dem Radioimmunoassayverfahren beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Antigen-Antikörper-Bindung. Dem Proteohormon Insulin als Antigen werden dabei spezifische Antikörper im Ansatz zugesetzt, außerdem aber auch weiteres, radioaktiv markiertes Insulin als Antigen, das sich immunologisch vom unmarkierten Insulin der Probe nicht unterscheidet. Beide Antigene konkurrieren im Test um die spezifischen Haftstellen am Antikörper. Die dabei entstehenden Antigen-Antikörper-Bindungen sind reversibel, das heißt, es gilt das Massenwirkungsgesetz, wonach sich entsprechend den jeweiligen Massenverhältnissen der Reaktionspartner ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Damit einzig die Mengen der beiden konkurrierenden Antigene reaktionsbestimmend werden, gibt man nur so viele Antikörper in den Ansatz, daß die Antigene stets im Überschuß bleiben. Anschließend trennt man den Antigen-Antikörper-Komplex vom ungebundenen Antigen und mißt die Radioaktivität des Komplexes im Sediment nach Abzentrifugieren. Da die Komplexbildung entsprechend den Mengenverhältnissen beider Hormone erfolgte, ist die gemessene Radioaktivität umgekehrt proportional dem Insulingehalt der Probe. Enthielt die zu untersuchende Probe nur wenig Insulin, binden die Antikörper vorwiegend das eingebrachte, radioaktiv markierte Insulin, und wir finden im Sediment eine hohe Radioaktivität. Mithilfe von Insulinstandards läßt sich die Methode eichen.

Für meine Untersuchungen verwendete ich das Radioimmun-

besteck der Behringwerke Marburg ("RIA-gnost^R Insulin, Bottle Assay"). Es besteht aus:

- ¹²⁵J-Insulin, ca. 10 ng, 2 mikroCi (Lyophilisat)
- Meerschweinchen-Anti-Schweineinsulin-Serum (Lyophilisat)
- 7 Schweineinsulinstandards S₀-S₆ ; Konzentrationen im Bereich von nominell 0-320 mU Insulin/l (Lyophilisate aus humanem Serum)
- Testserum mit deklarerter Insulinkonzentration (Lyophilisat)
- 110 ml Polyäthylenglykollösung (gebrauchsfertig)

Nach dem Lösen der Lyophilisate in je 500 Mikroliter bidestillierten Wassers wurden in einem Doppelansatz je 100 Mikroliter der Standards, des Testserums und der Proben in Plastikreagenzröhrchen pipettiert, anschließend je 100 Mikroliter der ¹²⁵J-Insulinlösung und schließlich 100 Mikroliter des Antiinsulinserums (Antikörper) hinzugegeben. Ein zusätzliches Röhrchenpaar zur Gesamtaktivitätsbestimmung enthielt nur je 100 Mikroliter der ¹²⁵J-Insulinlösung. Mit Ausnahme der Gesamtaktivitätsröhrchen wurden alle auf dem Mischrotor gemischt, mit Parafilm abgedeckt und bis zum nächsten Tag lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Aufschwemmung in 1 ml Polyäthylenglykol (Ausnahme: Gesamtaktivität) mit darauffolgender Mischhomogenisierung und Zentrifugation (15 Minuten bei 1500 g und 25° C) diente dazu, die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe vom freien Insulin

durch Fällung abzutrennen. Nach Dekantieren des Überstandes wurden schließlich die Röhren zusammen mit den Gesamtaktivitätsröhren und einem Röhrenpaar zur Bestimmung des Leerwertes mit einem Gammastrahlenzähler (Rack Gamma II der Fa. LKB Wallac) 60 Sekunden gemessen.

II. Hb-, Protein- und pH-Bestimmung

Sowohl das Hämoglobin als auch das Protein bestimmten wir in einem Eppendorffphotometer bei 546 nm. Die Hb-Messung erfolgte nach dem Prinzip der Hämicyanidmethode, die Proteinbestimmung nach der Biuretmethode. Zur Ermittlung des pH-Wertes diente ein pH-Meter Nr. 29 der Firma Knick mit einer kombinierten Glaselektrode.

III. Statistische Überprüfung der Insulinbestimmung

Anhand des bei dem Radioimmunoassay mitgeführten Kontrollserums führte ich eine Präzisions- (Standardabweichung von Tag zu Tag) und Richtigkeitskontrolle durch.

Für die Präzisionskontrolle berechnete ich den Mittelwert $\bar{x}$ der Analysenergebnisse x_i ($i=1, \dots, n$) nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

und die Standardabweichung s nach

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Hieraus ergibt sich der Variationskoeffizient VK zu

$$VK = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

Als Maß für die Richtigkeit oder besser Unrichtigkeit diene mir die prozentuale Abweichung der Analysenwerte vom Sollwert.

D. Versuchsanordnung

I. In-vitro-Ansätze zur Überprüfung von Einflüssen auf die Insulinbestimmungsmethode

1. Hämolysegrad

Um den von Dwenger und Trautschold (7) beschriebenen Hämolyseeinfluß auf die Insulinbestimmungsmethode zu überprüfen, benutzte ich mein eigenes Blut. Durch Nahrungsaufnahme etwa eine Stunde vor der Blutabnahme versuchte ich einen möglichst hohen Insulingehalt zu erzielen, um bei den versuchstechnisch bedingten Verdünnungsstufen nicht zu niedrige Insulinwerte zu erhalten. Nach 15minütiger Zentrifugation des Blutes bei 3000 U/min und Dekantieren des Serums wusch ich den Blutkuchen mit physiologischer NaCl-Lösung aus und gewann aus ihm direkt und ohne Zusätze durch 15minütige Ultraschallbestrahlung (Sonifier^R B 12 der Branson Sönic Power Company) ein Hämolysat, dessen Hb-Gehalt ich bestimmte. Mit bidestilliertem Wasser stellte ich eine Verdünnungsreihe auf, wobei ich das Ausgangshämolysat zweimal 1 : 1 und die folgenden Verdünnungsstufen jeweils 1 : 4 verdünnte.

Von dem Blutserum füllte ich jeweils 1 ml in 9 Plastikreagenzröhrchen ab und mischte 8 Proben mit je 1 ml Hämolysat, so daß die Hb- und Insulinkonzentrationen 1 : 1 verdünnt wurden; in das 9. Röhrchen gab ich als Volumenäquivalent 1 ml bidestilliertes Wasser hinzu. Im Radioimmunoassay bestimmte ich die Insulinkonzentrationen der hämolysierten Seren gegen den Insulingehalt der nicht-hämolysierten Proben.

2. Hemmstoffzusätze

Serum- und Hämolysatherstellung erfolgte wie unter D.I.1. beschrieben.

Den Hemmstoff N-Äthylmaleinimid (Molekulargewicht 125.1) gab ich in abgewogenen Mengen (250.2, 125.1, 75, 62.55, 37.5, 31.28, 18.75 mg) in 10-ml-Erlenmeyerkolben und füllte anschließend mit Serum bis zur 10-ml-Marke auf, so daß ich Lösungen mit Hemmstoffkonzentrationen von 200, 100, 60, 50, 30, 25, 15 mmol/l erhielt. Je 1 ml dieser Serumlösungen pipettierte ich in Plastikreagenzröhrchen und verdünnte sie mit 1 ml bidestilliertem Wasser. Mit dieser Probenreihe wollte ich eine Wechselwirkung des Hemmstoffes mit der Antigen-Antikörper-Bindung ausschließen. Außerdem vermischte ich je 1 ml der 50- und 25-mmolaren Lösungen mit der gleichen Menge Hämolysat in den verschiedenen Verdünnungsstufen. Alle Proben wurden zusammen mit den Seren von D.I.1. in den RIA-Ansatz gebracht und die Insulinkonzentrationen bestimmt.

3. pH des Ansatzes

In einem weiteren Versuchsansatz mit Humanserum (Gewinnung und Aufbereitung wie unter D.I.1. beschrieben) wollte ich überprüfen, inwieweit die von Gennaro und Norman (9) festgestellte pH-Abhängigkeit der Sedimentation des Antigen-Antikörper-Komplexes die Insulinbestimmungsmethode beeinflusst.

In 5 Plastikreagenzröhrchen wurden dazu je 0.9 ml der

Serumprobe abgefüllt. Einer Serumprobe setzte ich 0.02 ml 1 N NaOH-Lösung zu, drei weiteren fügte ich 0.02, 0.04 und 0.07 ml 1 N HCl-Lösung bei und füllte dann alle Proben mit bidestilliertem Wasser bis 1 ml auf. Nach Zugabe von je 1 ml Hämolytat (Gewinnung wie unter D.I.1.) und Durchmischung bestimmte ich die pH-Werte der Lösungen. Je 0.5 ml der Proben vermischte ich mit 0.5 ml Polyäthylenglykollösung (siehe C.I.) und ermittelte erneut die pH-Werte. Schließlich wurde nach dem RIA-Verfahren der Insulingehalt der Proben bestimmt.

4. Proteingehalt des Ansatzes

Als ich versuchte, mit einer verdünnten Insulinstandardlösung den Hemmstoffeinfluß auf die Insulinbestimmung zu überprüfen, erhielt ich ausnahmslos sehr hohe RIA-Werte. Diese Tatsache ließ eine Abhängigkeit der RIA-Methode vom Proteingehalt des Ansatzes vermuten.

Zur Bestätigung der Vermutung verdünnte ich 1 ml Standardhumaninsulin der Firma Hoechst (40 U/ml) mit bidestilliertem Wasser in zwei Schritten in je einem 1-Liter-Meßzylinder um den Faktor 1000000, so daß eine theoretische Insulinkonzentration von 40 mU/l resultierte. 0.2 ml dieser Lösung vermischte ich mit 0.2 ml eines Standardhumanserums der Firma Behringwerke und bestimmte den Insulingehalt. Als Vergleichsproben setzte ich im RIA-Ansatz die verdünnte Insulinlösung und das Standardhumanserum ein.

In einem ansonsten gleichen Versuchsansatz ersetzte ich das Standardhumanserum durch 5- und 20%iges Rinderserumalbumin der Firma Behringwerke.

5. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe

1 ml des Standardhumaninsulins der Firma Hoechst (40 U/ml) verdünnte ich in einem 1-Liter-Meßzylinder mit bidestilliertem Wasser 1 : 1000. In einem weiteren Meßzylinder gab ich zu 0.8 ml dieser Lösung erneut bidestilliertes Wasser bis zur 160-ml-Marke, so daß ich eine theoretische Insulinkonzentration von 200 mU/l erreichte. Nach folgendem Schema setzte ich die Insulinlösung nichthämolysiertem und hämolysiertem (ohne und mit Hemmstoff, 25 mmol/l) Humanserum zu:

- a) 0.5 ml Insulinlösung + 0.5 ml Humanserum
- b) 1.0 ml Insulinlösung + 0.5 ml Humanserum (ohne Hemmstoff)
+ 0.5 ml Hämolysat
- c) 1.0 ml Insulinlösung + 0.5 ml Humanserum (mit Hemmstoff)
+ 0.5 ml Hämolysat

Im RIA bestimmte ich den Insulingehalt dieser Lösungen gegenüber dem reinen Humanserum als Vergleichsprobe. Humanserum und Hämolysat wurden wie unter D.I.1. gewonnen und hergestellt.

II. Ansatz mit Leichenblut

1. Insulingehalt ohne und mit Hemmstoffzusatz

Das untersuchte Leichenblut stammte aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin; es wurde jeweils dem rechten Herzen entnommen. Das Geschlecht der Leichen berücksichtigte ich nicht, achtete aber darauf, daß

- a) aus den Sektionsunterlagen, dem Sektionsbefund und einem Glucotest sich kein Anhalt für Diabetes ergab, um eine Beeinträchtigung des RIA-Verfahrens vonseiten der dann vorliegenden Insulinantikörper - wie von Berson und Mitarbeitern (3) nachgewiesen - auszuschließen
- b) das Leichenalter und der Grad der Fäulnis festgehalten wurden, um daraus möglicherweise eine Beziehung zu den RIA-Insulinwerten erkennen zu können.

Durch Zentrifugation (15 Minuten bei 3000 U/min) gewann ich aus dem Leichenblut ein unterschiedlich stark hämolyisiertes Serum, dessen Hb-Gehalt ich bestimmte. In je 2 ml Serum löste ich 6.26 mg N-Äthylmaleinimid (Molekulargewicht 125.1), so daß ich eine Hemmstoffkonzentration von 25 mmol/l erzielte. Diese Proben bewahrte ich zusammen mit dem Serum ohne Hemmstoffzusatz im Gefrierschrank bei -25° C bis zur Insulinbestimmung auf.

2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes

0.8 ml einer Standardhumaninsulinverdünnung (Herstellung siehe unter D.I.5.) vermischte ich mit 159.2 ml frisch entnommenem Leichenblut, um eine theoretische Insulinkonzentration von 200 mU/l zu erzielen. Nach Aufteilung des Blutes zu gleichen Teilen entnahm ich beiden Pools (ständige Aufbewahrung bei 4° C bzw. 22° C) je 5 ml und zentrifugierte die Proben 15 Minuten bei 3000 U/min; in dem Überstand bestimmte ich den Hb-Gehalt. Je 0.5 ml des Überstandes vermischte ich mit gleichen Volumina einer Lösung, die 5 ml 0.07 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 + KH_2PO_4 , pH = 7.4) und 5 ml Standardhumanserum enthielt und in welcher N-Äthylmaleinimid in einer Konzentration von 50 mmol/l (62.56 mg) gelöst war. Nach Bestimmung des pH-Wertes und des Proteingehaltes fror ich die Probe ein. Diesen Vorgang wiederholte ich nach 1,4,8,12,25,37 und 48 Stunden und ermittelte schließlich in allen Proben und in dem als Zusatz verwendeten Standardhumanserum den Insulingehalt.

E. Ergebnisse

I. Statistische Überprüfung der Insulinbestimmung

Für die Berechnung der Standardabweichung von Tag zu Tag ergaben sich nach 20 Bestimmungen an 20 verschiedenen Tagen folgende Werte (Sollwert: 70 mU/l):

Analysenwert (mU/l)	prozentuale Abweichung vom Sollwert (%)
66.0	5.71
67.7	3.29
66.4	5.14
71.1	1.57
72.8	4.00
71.1	1.57
65.3	6.71
65.2	6.86
64.5	7.21
65.1	7.00
64.6	7.71
75.6	8.00
65.2	6.86
65.1	7.00
74.4	6.29
67.7	3.29
70.0	0.00
68.4	2.29
68.5	2.14
72.5	3.57

Hieraus errechnet sich ein Mittelwert von

$$\bar{x} = 68.36 \text{ mU/l}$$

und eine Standardabweichung von

$$s = \pm 3.51 \text{ mU/l}$$

vom Mittelwert.

Der Variationskoeffizient als Maß für die Präzision liegt mit 5.13% deutlich unter der für Enzymbestimmungen geforderten 10%-Marke.

Aus der Wertetabelle ist ersichtlich, daß

- kein Analysenwert außerhalb des Kontrollbereiches ($\bar{x} - 3s$, $\bar{x} + 3s$) liegt
- keine sieben aufeinanderfolgenden Werte auf einer Seite des Mittelwertes liegen
- keine sieben aufeinanderfolgenden Werte eine ansteigende oder abfallende Tendenz zeigen.

Die angewandte Methode ist somit unter Kontrolle.

Die prozentuale Abweichung der Analysenwerte vom Sollwert beträgt stets unter 10% und genügt folglich den Anforderungen der Richtigkeitskontrolle.

II. In-vitro-Versuche zur Überprüfung der Einflüsse auf die Insulinbestimmung

1. Hämolysegrad

Das unverdünnte Hämolysat hatte einen Hb-Gehalt von 286.81 g/l.

In dem nichthämolysierten Serum betrug die Insulinkonzentration 23.1 mU/l. Für den Insulingehalt der hämolysierten erhielt ich folgende Werte:

Hb-Konzentration der Probe (g/l)	Insulinkonzentrationen in mU/l
71.71	412.5
35.86	368.9
7.17	150.2
1.43	80.0
0.29	49.0
0.057	45.0
0.011	25.5
0.0023	24.7

2. Hemmstoffzusätze

Die Insulinbestimmung in den hämolysierten Serumproben mit Hemmstoffzusatz (Hemmstoffkonzentrationen 25 und 12.5 mmol/l) erbrachte folgende Werte:

Hb-Konzentration der Probe (g/l)	- Insulinkonzentrationen in mU/l -	
	Hemmstoffkonzentr. 25 mmol/l	Hemmstoffkonzentr. 12.5 mmol/l
71.71	29.5	13.6
35.86	27.3	10.0
7.17	26.3	13.4
1.43	20.5	13.3
0.29	19.0	13.9
0.057	21.4	16.7
0.011	22.4	17.9
0.0023	26.4	16.2

In den nur mit Hemmstoff versetzten Seren fand ich an Insulinkonzentrationen:

Hemmstoff-
konzentr. 100 50 30 25 15 12.5 7.5
(mmol/l)

Insulin-
werte 811.3 403.6 18.8 25.4 17.7 15.8 10.1
(mU/l)

3. pH des Ansatzes

Das dem Serum zugesetzte Hämolysat hatte einen Hb-Gehalt von 134.2 g/l. In Abhängigkeit vom pH der Probe bzw. der Proben-Polyäthylenglykol-Lösung (Probe/PEG) erhielt ich als Insulinkonzentrationen:

	pH (Probe)	pH (Probe/PEG)	RIA-Insulinwert in mU/l
Humanserum			
+ Hämolysat	8.0	8.6	51.6
Humanserum			
+ Hämolysat			
+ 1N NaOH (0.02 ml)	8.8	9.1	50.3
Humanserum			
+ Hämolysat			
+ 1N HCl (0.02 ml)	7.6	8.2	37.7
Humanserum			
+ Hämolysat			
+ 1N HCl (0.04 ml)	6.5	7.3	7.2
Humanserum			
+ Hämolysat			
+ 1N HCl (0.07 ml)	5.2	6.3	2.2

4. Proteingehalt des Ansatzes

Die Überprüfung des Proteineinflusses auf die RIA-Insulinwerte brachte als Ergebnis:

RIA-Werte in mU/l		
standardisierte, serumfreie Insulinlösung	778.8	
standardisierte Insulinlösung + Standardhumanserum	19.0	theoretische Insulin- konzentr.: 21.5 mU/l
Standardhumanserum	3.09	

Beim Ersatz des Standardhumanserums durch standardisiertes Rinderserumalbumin ergab sich ein anderes Bild:

RIA-Werte in mU/l		
standardisierte, serumfreie Insulinlösung	778.8	
standardisierte Insulinlösung + Rinderserumalbumin		
a) 5%ig	744.9	
b) 20%ig	225.8	
Rinderserumalbumin		
a) 5%ig	709.9	
b) 20%ig	51.9	

5. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe

Das Hämolysat, das als Zusatz zu den Serumproben verwendet wurde, hatte eine Hb-Konzentration von 257.39 g/l; als Insulinwerte ergaben sich:

Insulingehalt in mU/l

Serum	9.6	
Serum + Insulin	93.1	theoretischer Insulinwert: 104.8 mU/l
Serum + Hämolysat		
+ Insulin	329.0	
Serum + Hemmstoff +		
Hämolysat + Insulin	57.8	

III. Insulinbestimmung im Leichenblut

1. Insulingehalt ohne und mit Hemmstoffzusatz

Die folgende Übersicht zeigt das Ergebnis der RIA-Insulinbestimmung im Leichenblut. Sie erfolgte grundsätzlich im abzentrifugierten Serum, in zwei Fällen bestimmte ich zum Vergleich auch den Insulingehalt im vollhämolysierten Blut. Die Tabelle ist nach dem Hb-Gehalt der Proben geordnet, außerdem sind aus ihr noch Leichenalter und ggf. Besonderheiten ersichtlich, die sich aus den Sektionsunterlagen ergaben.

Leichenserien:	- Insulinkonzentrationen(mU/l) -	
- Hb-Konzentration(g/l)	ohne	mit
- (vermutl.)Leichenalter	Hemmstoff	
- Besonderheiten	(25 mmol/l)	
1)-1.83		
-2 Tage	5.3	3.3
- ø		
2)-9.19		
-3 Tage	4.5	2.3
-keine Fäulnis		
3)-11.03		
-4 Tage	6.5	4.2
-geringe Fäulnis		
4)-12.87		
-4 Tage	7.0	3.7
-spärl. Totenflecke		
5)-12.87		
-3 Tage	2.8	2.6
-ausgedehnte Totenflecke		
6)-14.7		
-3 Tage mindestens	8.4	4.5
-keine Fäulnis		
7)-18.4		
-5 Tage mindestens	17.1	6.1
-teils kräftige Toten- fleck		

Leichenseren:	- Insulinkonzentrationen(mU/l) -	
- Hb-Konzentration(g/l)	ohne	mit
- (vermutl.)Leichenalter	Hemmstoff	
- Besonderheiten	(25 mmol/l)	
8)-40.45		
-4 Tage mindestens	8.9	3.7
-grünfaule Leiche		
9)-47.8		
-11 Tage mindestens	15.0	6.7
- ø		
10)-62.5		
-4 Tage mindestens	83.5	29.7
-erhebliche Fäulnis		
11)-97.44		
-5 Tage mindestens	174.5	1.97
-beginnende Fäulnis		
12)-104.79		
- ø	24.9	4.3
- ø		
13)-Blut:128.7	61.2 (Blut)	3.8
Serum:7.35	5.9 (Serum)	5.3
-5 Tage mindestens		
-kräftige Totenflecke		

Leichenseren:	- Insulinkonzentrationen(mU/l) -	
- Hb-Konzentration(g/l)	ohne	mit
- (vermutl.)Leichenalter	Hemmstoff	
- Besonderheiten	(25 mmol/l)	
14)-132.37		
-5 Tage mindestens	63.7	1.6
-kräftige Totenflecke		
15)-136.05		
-3 Tage mindestens	10.9	10.3
-mäßige Fäulnis		
16)-139.73		
-3 Tage mindestens	56.9	1.7
-mittelkräftige Toten- fleck		
17)-143.40		
-ca. 3 Tage	34.2	3.7
-kräftige Totenflecke		
18)-145.24		
-38 Tage mindestens	8.1	2.7
-starke Verwesung, Wasserleiche(!)		
19)-154.40		
-ca. 3 Tage	17.1	6.1
-kräftige Totenflecke		

Leichenseren:	- Insulinkonzentrationen(mU/l) -	
- Hb-Konzentration(g/l)	ohne	mit
- (vermutl.)Leichenalter	Hemmstoff	
- Besonderheiten	(25 mmol/l)	
20)-Blut: 194.88	60.0 (Blut)	2.0
Serum: 11.03	5.2 (Serum)	4.9
-4 Tage mindestens		
-geringe Fäulnis		
21)-194.88		
-3 Tage mindestens	28.3	1.1
- ø		
22)-209.59		
-ca. 3Tage	10.8	2.3
-beginnende Fäulnis,		
fragliche Insulinüber-		
dosierung (Suizid)		

2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes

In der nachfolgenden Tabelle sind die ermittelten Werte in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des einige Stunden nach Todeseintritt entnommenen Leichenblutes aufgestellt. Die mit "A" gekennzeichneten Proben wurden bei 4° C (Kühlschrank) und die mit "B" markierten bei 22° C (Raumtemperatur) aufbewahrt. Das als Zusatz verwendete Standardhumanserum hatte einen Insulingehalt von 30.3 mU/l.

Jeder Ansatz war gepuffert, mit N-Äthylmaleinimid versetzt und nach Absatz D.II.2. verdünnt.

Aufbewahrungs-

zeit/h		0	1	4	8	12	25	37	48
Insulin (mU/l)	A:	7.7	6.4	8.9	6.1	6.9	8.5	9.2	7.2
	B:	7.3	7.2	8.1	6.8	7.3	8.7	7.4	8.9
pH	A:	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	7.4
	B:	7.2	7.4	7.4	7.4	7.5	7.3	7.3	7.4
Hb (g/l)	A:	56.2	55.4	55.0	56.6	60.7	55.2	57.0	55.2
	B:	56.6	53.5	55.0	55.5	64.7	57.4	58.8	57.0
Protein (g/l)	A:	34.9	37.3	31.1	37.4	37.9	39.9	37.7	36.7
	B:	32.7	32.8	32.6	33.5	34.0	37.1	37.8	42.5

F. Diskussion

I. Einflußfaktoren

1. Hämolysegrad

Die in-vitro-Versuche belegen, wie stark Hämolyse die Insulinbestimmung beeinflußt. Schon bei einer Hämoglobinkonzentration von 0.057 g/l lag der Insulinwert mit 45.0 mU/l doppelt so hoch wie bei der nichthämolysierten Vergleichsprobe (23.1 mU/l).

Auch beim Leichenblut ist eine Abhängigkeit zwischen Hb-Gehalt der Probe und ermittelter Insulinkonzentration zu erkennen. Zwar steigen die Insulinwerte mit stärkerer Hämolyse nicht so stetig wie in den in-vitro-Versuchen mit Humanserum, auffallend ist jedoch eine Häufung hoher Konzentrationszahlen mit steigendem Hb-Gehalt der Proben. Diese Tatsache wurde besonders deutlich, als ich in zwei Leichenblutproben die Insulinkonzentration zum Vergleich im Blut und im Serum bestimmte (siehe Tabelle).

2. Hemmstoffzusätze

Der Zusatz von N-Äthylmaleinimid bewirkte in den hämolysierten Seren mit hohen Insulinkonzentrationswerten einheitlich eine Senkung der Konzentrationszahlen. Aber wie die Vergleichsbestimmungen mit den nichthämolysierten Seren zeigen, übt der Hemmstoff offenbar nur in einer optimalen Konzentration um 25 mmol/l (siehe unter E.II.2.) selbst keinen Einfluß auf die Antigen-Antikörper-Reaktion aus. Höhere Konzentrationen führen zu einem sprunghaften Anstieg der RIA-Insulinwerte;

ist der Hemmstoff weniger konzentriert, resultieren niedrigere Konzentrationsangaben. Dwenger und Trautschold (7) haben in ihrer Arbeit offensichtlich mit 12 mmol/l eine nichtoptimale Hemmstoffkonzentration verwendet. Eine Begründung für ihre Konzentration geben sie auch nicht an.

N-Äthylmaleinimid gehört mit einem Molekulargewicht von 125.1 zu den Stoffen, die in hohen Konzentrationen Proteine in Lösung halten können. In diesem Sinne könnte es im RIA-Ansatz der Sedimentation entgegenwirken, die die Berechnungsgrundlage für die Konzentrationsangaben ist. Ein anderes Salz müßte demnach einen ähnlichen Effekt auf die RIA-Messung haben wie N-Äthylmaleinimid. Als ich im Humanserum den Insulingehalt ohne und mit Zusatz von Natriumbarbiturat (Molekulargewicht 206.18; Konzentration 100 mmol/l) bestimmte, zeigten sich bei der Probe mit dem Barbituratzusatz denn auch 4 1/2 mal höhere Werte (22.6 mU/l) als bei der Vergleichsprobe mit 5 mU/l.

Darüberhinaus ist eine Anlagerung von ^{125}J an die Doppelbindung des Hemmstoffes denkbar; dadurch würde die Aktivität in der löslichen Phase erhöht und somit eine höhere Insulinkonzentration vorgetäuscht.

Die niedrigen Wiederfindungsraten bei geringerer Hemmstoffkonzentration als 25 mmol/l sind zu erklären, wenn man sich einen Aussalzungseffekt auf den Antigen-Antikörper-Komplex vorstellt.

3. pH- Wert

Nach Zugabe des Polyäthylenglykols zu der hämolysierten Serumprobe stieg das pH geringfügig an. Erreichte es in der Proben-Polyäthylenglykol-Lösung Werte über 8, lagen die RIA-Insulinwerte erheblich höher als bei saurem pH. Insofern wurden die Ergebnisse von Gennaro und Norman (9) hinsichtlich des pH-Einflusses auf die Antigen-Antikörper-Fällungsreaktion bestätigt. In zwei Leichenserproben, bei denen ich ein pH(Probe/Polyäthylenglykol) von 6.9 bzw. 7.0 maß, fand ich bezeichnenderweise RIA-Insulinwerte von nur 4.3 bzw. 2.3 mU/l. Im dabei verwendeten RIA-Kit befand sich kein Puffer.

4. Proteingehalt

Aus dem Versuchsansatz geht hervor, daß in der verdünnten Standardinsulinlösung eine Insulinkonzentration um 40 mU/l zu erwarten war; tatsächlich lag der RIA-Wert bei 778.8 mU/l. Nach Zugabe von gleicher Menge an Standardhumanserum erhielt ich dann einen RIA-Wert von 19 mU/l. Unter Berücksichtigung des Insulineigengehaltes des unverdünnten Humanserums (3.09 mU/l) betrug hier die theoretische Insulinkonzentration ($20 + 1.5$) mU/l = 21.5 mU/l (Verdünnung der Standardinsulinlösung mitberechnet). Die Wiederfindungsrate liegt somit bei 88.4 %.

Der überhöhte Insulinwert in der standardisierten Humaninsulinlösung deutete sich schon beim Versuchsansatz an. Nach der Fällungsreaktion war in den Plastikröhrchen kein Niederschlag zu erkennen; die vom Zähler

gemessene Aktivität mußte somit minimal und die daraus berechnete Konzentration letztlich hoch sein (siehe Prinzip des RIA-Verfahrens).

Wie der weitere Versuch zeigte, läßt sich das teure Standardhumanserum nicht durch das billigere Rinder-serumalbumin ersetzen. In ihm scheint ein für die Antigen-Antikörper-Reaktion nötiges Komplement zu fehlen.

II. Wiederfindung von zugesetztem Insulin zur normalen und hämolysierten Serumprobe

Das Humanserum hatte eine Insulinkonzentration von 9.6 mU/l. Nach Zusatz der verdünnten Standardinsulinlösung im Verhältnis 1 : 1 lag der theoretische Insulingehalt bei 104.8 mU/l. Mit 93.1 mU/l wurde eine tolerierbare Wiederfindung erreicht. Erwartungsgemäß stieg der RIA-Wert mit 329 mU/l beträchtlich an, nachdem dem Ansatz das Hämolysat zugesetzt wurde. Der Hemmstoff vermochte diesen Hämolysseeinfluß auszuschalten. Es wurden aber nur ca. 50% der erwarteten Insulinmenge ermittelt. Dieses Ergebnis überrascht, nachdem in den Vorversuchen (E.II.2.) der ursprüngliche Insulingehalt des hämolysierten Humanserums nach Hemmstoffzusatz annähernd wiedergefunden wurde.

III. Insulinwerte im Leichenblut

1. Literaturwerte

Im Herzblut liegen nach unseren Messungen bereits zwei Tage nach dem Tode die Insulinwerte nur in Bereichen von ca. 2-10 mU/l. Unter Berücksichtigung aller Faktoren, die auf die RIA-Bestimmungsmethode störend wirken können, entsprechen die in der Literatur (14,18,22) zu findenden hohen Insulinwerte von mehreren Hundert mU/l, die nach dem routinemäßigen RIA-Verfahren bestimmt wurden, wohl nicht den tatsächlichen Insulinkonzentrationen. Daß von den Autoren (14,18) oftmals große Konzentrationsunterschiede im herznahen und peripheren Blut festgestellt wurden, könnte an den unterschiedlich schnellen Proteolyse- und Hämolysevorgängen im Körper liegen. So bemerken Schneider und Dulce in ihrer Arbeit (18), daß die Fäulnisveränderungen im Bereich der Gewebsentnahme (ermittelte Insulinkonzentrationen: 6 mU/g) sehr viel weniger stark ausgeprägt waren als am Rumpf und an den Stammgefäßen, aus denen die Blutprobe stammte (Insulinwert: 500 mU/l).

2. Insulingehalt, pH, Hb- und Proteingehalt in Abhängigkeit von der Aufbewahrungszeit des entnommenen Leichenblutes

Die Aufbewahrungszeit hatte im wesentlichen keinen Einfluß auf die Meßparameter Insulin, pH, Hb- und Proteingehalt, so daß für den begrenzten Versuchszeitraum von 48 Stunden zumindest weiterlaufende postmortale Veränderungen im Leichenblut nicht nachzuvollziehen waren.

Die gemessenen Insulinkonzentrationen lagen mit Werten

unter 10 mU/l erstaunlich tief; ohne Berücksichtigung des ursprünglichen Insulingehaltes des Leichenblutes war eine Insulinkonzentration um 107.5 mU/l (theoretische Berechnung) zu erwarten. Dieser Befund ist eigentlich nur zu erklären, wenn man schnell wirkende, den Aussalzungseffekt bei der Antigen-Antikörper-Reaktion fördernde Stoffe oder proteolytisch abbauende Enzyme im Leichenblut zusätzlich annimmt.

3. Postmortale Proteolysevorgänge

Neben der Wirkung des durch Hämolyse freigesetzten erythrozytären Enzyms auf die RIA-Methode fällt auf, daß die Insulinwerte von Leichen mit einer Liegedauer bis zu zwei Tagen niedrig sind, während mit längerer Liegedauer auch die Tendenz zu höheren Werten zunimmt; bei den 11 und 38 Tage alten Leichen fand ich wieder eher niedrige Insulinkonzentrationen. Dieses Phänomen ließe sich dadurch erklären, daß direkt nach dem Tode der Insulinabbau im Vordergrund steht, später das aus den Erythrozyten austretende Enzym erhöhte Insulinkonzentrationen vortäuscht, bis es schließlich selbst gemeinsam mit Insulin proteolytisch inaktiviert wird.

4. Empfehlung für die Insulinbestimmung im Leichenblut und -gewebe und die Beurteilung der Meßwerte

Für die Insulinbestimmung im Leichenblut und -gewebe ist es unabdingbar, den aufgezeigten Störgrößen Rechnung zu tragen:

1. Den Auswirkungen der Hämolyse auf das Meßverfahren sollte durch Zusatz des Hemmstoffes N-Äthylmaleinimid in einer Konzentration von 25 mmol/l begegnet werden.
2. Standardhumanserum gewährleistet als Komplement-träger den richtigen Niederschlag des Antigen-Antikörper-Komplexes. Diese Erkenntnis ist insbesondere beim Verdünnen von Extrakten im Rahmen von Gewebsanalysen zu berücksichtigen.
3. Den pH-Einfluß auf die Fällungsreaktion gleicht man am besten mit einem Puffer aus. Manche RIA-Bestecke enthalten ihn schon, bei den anderen soll man Phosphatpuffer (pH = 7.4) ergänzen.

Wenn anamnestisch sich eine Zufuhr von Insulin ermitteln läßt (Diabetiker, Suizidversuche mit Insulin), empfiehlt es sich außerdem, neben der eigentlichen Insulinbestimmung die sich dann im Serum befindlichen Antikörper zu bestimmen (9), da sie die Insulinmessung verfälschen können.

Die auch nach Beachten der bekannten Störfaktoren möglichen Aussagen über den Insulingehalt im Leichenblut und -gewebe können nur relativ sein. Der Gutachter kann

die tatsächlichen Insulinkonzentrationen nicht absolut angeben, sondern nur mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, daß der ausgewiesene RIA-Wert sich proportional zur tatsächlichen Konzentration verhält. Je größer der Meßwert nach Pufferung, Hemmstoff- und Komplementzusatz gefunden wird, desto höher kann der ursprüngliche Insulingehalt angenommen werden. Es ist sinnvoll, die RIA-Insulinbestimmung unter Berücksichtigung der Einflußfaktoren jeweils ohne und mit Hemmstoff durchzuführen. Niedrige Werte ohne Hemmstoffzusatz können dabei direkt übernommen werden und verändern sich nach Hemmstoffzusatz in der Regel auch nur unwesentlich. Findet man aber ohne Hemmstoffzusatz hohe RIA-Insulinwerte, so gilt eine Insulintoxikation als wahrscheinlich, wenn auch nach Hemmstoffzugabe der Insulinwert noch deutlich erhöhte Konzentrationen zeigt. Dagegen dürfte keine Aussage über den Insulingehalt für den Fall zu machen sein, daß hohe Ausgangswerte nach Hemmstoffzusatz in den subnormalen Bereich absinken. Schließlich sollte die Beurteilung von postmortal gewonnenen Insulinwerten angesichts der diskutierten zeitabhängigen Proteolyseeinflüsse auf die Bestimmungsmethode ein kritisches Abwägen der Liegezeit der Leiche vor der Blutentnahme einschließen. Bei Gewebeuntersuchungen ist ein Zusatz von Humanserum als Komplement zu den wäßrigen Extrakten unbedingt erforderlich.

G. Zusammenfassung

Die Gerichtsmedizin steht vor dem Problem, einen Insulintod bei bestehendem Verdacht nicht mit letzter Sicherheit nachweisen zu können. Auch die sonst so bewährte und routinemäßig durchgeführte serologische Bestimmung nach dem RIA-Verfahren versagt, weil offenbar postmortal abgelaufene Vorgänge wie Hämolyse und Proteolyse sich auf den Radioimmunoassay auswirken.

Unsere Frage war, ob diese Störfaktoren erfaßbar und so weit auszuschalten sind, daß verlässliche Angaben über Insulinwerte im Leichenblut oder -gewebe zu machen sind und damit Aussagen zu Insulintodesfällen sicherer möglich werden. Wir untersuchten in-vitro-Einflüsse auf die Insulinbestimmung und Herzblut von 22 Leichen und zeigten, daß Hämolysegrad, pH-Wert und ein Humanserumkomplement die Methode empfindlich beeinflussen. Aber auch das Alter der Leiche bestimmte die Insulinwerte im Blut mit.

Die bisherigen im Herzblut von Leichen angegebenen sehr hohen Insulinkonzentrationen (ca. 500 - 700 mU/l) entsprechen nach unseren Befunden nicht dem wahren Insulingehalt. Er liegt bei höherem Hämolysegrad vielmehr zwischen 2 und 10 mU/l, in Einzelfällen bei Werten bis 30 mU/l.

Bereits innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem Tode erreichen die Insulinkonzentrationen im Serum diese niedrigen Werte. Zwischen dem 3. und 11. Tag nach dem Tode scheint vorübergehend eine geringe steigende Tendenz der Werte zu bestehen.

Wir empfehlen, die Insulinbestimmung im Leichenblut oder

-gewebe deshalb unter Beigabe des Hämolyseenzymhemmstoffes N-Äthylmaleinimid, eines Phosphatpuffers von pH 7.4 und - sofern stark mit Wasser verdünnt wird - von Human-serunkomplement durchzuführen.

Trotz verbesserter Meßmethode ist im Leichenblut der Insulingehalt nur relativ hinsichtlich seiner biologischen Richtigkeit zu verwerten. Aussagekräftig im Hinblick auf einen Insulintod sind nur nach Fennstoff-, Puffer- und ggf. Humanserunkomplementzusatz verbleibende erhöhte Meßwerte im Leichenblut oder -gewebe.

H. Literatur

1. Bauman, W.A., Yalow, R.S.: Insulin as a lethal weapon. Journal of Forensic Sciences, JFSCA, Vol.26, No.3, (1981), 594-598
2. Belin, J., Roux, M.: L' intoxication insulinique, existe-t-elle?, Ann. Méd. interne, 127,no. 8-9, (1976), 656-659
3. Berson, S. A., Yalow, R.S.: Immunoassay of plasma insulin. Ciba Found. Coll. Endocrinol. 14, (1962), 182-201
4. Birkinshaw, V.J., Gurd, M.R., Randall, S.S., Curry, A.S., Price, D.E., Wright, P.E.: Investigations in a case of murder by insulin poisoning. Brit. Med. Journal, London, (1958), 463-468
5. Bourgeois, M.: Suicides insuliniques. Un nouveau cas d'injections massives d'insuline chez une diabétique. Annales médico-psychologiques (Paris), 132, (1974), 631-640
6. Dickson, S.J., Cairns, E.R.: The isolation and quantification of insulin in post-mortem specimens - a case report. Forensic Science, 9 (1977), 37-42
7. Dwenger, A., Trautschold, I.: Zum Einfluß von Hämolyse, Harnstoff und Bilirubin auf die Präzision radioimmuno-logischer Digoxin- und Insulinbestimmungen. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. Vol. 20 (1982), 29-38

8. Euler-Rolle, J., Gripperich, G.: Suizidversuch mit 1200 E Insulin. Wierer Klin. Wochenschrift, Jg.82, Heft 37, (1970), 643-645
9. Gennaro, W.D., Van Norman, J.D.: Quantification of free, total and antibody-bound insulin in insulin-treated diabetics. Clin. Che. 21/7, (1975), 873-879
10. Hänsch, Chr. Fr., Roy, de G.: An extraordinary case: suicide with insulin in a grave dug by the victim himself. Z. Rechtsmed. 79, (1977), 319-320
11. Heyndrickx, A., Van Peteghem, C., Majelyne, W., Timperman, J.: Detection of insulin in cadavers. Acta Pharmaceutica Hungarica 50, (1980), 201-206
12. Holldorf, L., Zubaidi, G., Wendel, H.: Suizidversuch mit Insulin als seltene Ursache eines Myokardinfarktes. Zschr. Inn. Med. Jahrg. 26 (1971), 538-540
13. Kolb, H. J., Standl, E.: Purification to homogeneity of an insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., Bd. 361, (1980), 1029-1039
14. Lindquist, O. u. Rammer, L.: Insulin in post-mortem blood. Z. Rechtsmed. 75, (1975), 275-277
15. Martin, F., Hansen, N., Warne, G.: Attempted suicide by insulin overdose in insulin-requiring diabetics. The Medical Journal of Australia, (1977), 58-59

16. Oksanen, Aulikki: Insulin in post-mortem blood. A comment. Z. Rechtsmed. 77, (1976), 311-312
17. Phillips, A. P., Webb, B., Curry, A.S.: The detection of insulin in post-mortem tissues. Journal of Forensic Sciences, (1972), 460-463
18. Schneider, V. u. Dulce, H.-J.: Suizidale Vergiftungen mit Insulin und ihr Nachweis an der Leiche (Radioimmunoassay), Arch. Kriminol. Bd. 164, (1979), 142-152
19. Schuck, M., Liebhardt, E., Tröger, H.-D., Schuller, E.: Insulinbestimmung mittels Radioimmunoassay an Leichenblut. Sonderdruck aus: Beiträge zur Gerichtl. Medizin, Bd. XXXIX, (1981)
20. Schweisheimer, W.: Mord und Selbstmord durch Insulin. Med. Klin., 25 (1963), 1046-1047
21. Stefan, J.: Beitrag zur postmortalen Diagnose der Insulinvergiftung. Zbl. allg. Path., Bd. 119, (1975), 56-59
22. Stofer, A.R.: Suizid mit Insulin und Nachweis des Insulins an der Leiche. Arch. Toxikol. 26, (1970), 1-7
23. Sturner, W.Q., B.S., M.D., D.M.J. and R.S. Putnam, M.D.: Suicidal insulin poisoning with nine day survival: recovery in bile at autopsy by radioimmunoassay. J. For. Sci., (1972), 514-521

I. Lebenslauf

Am 19. Juni 1953 wurde ich als zweites Kind des Postbeamten Hermann Hoffmann und seiner Ehefrau Ottilia in Obersalbach geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Obersalbach/Kurhof, wechselte dann auf die Knabenrealschule und später auf das Wirtschaftswissenschaftliche Gymnasium in Saarbrücken über, wo ich 1972 das Abitur erwarb.

An der Freien Universität Berlin nahm ich 1973 ein Studium in Mathematik und Physik auf. 1978 begann ich mit dem Medizinstudium, das ich 1984 mit dem Staatsexamen abschloß.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Dulce danke ich
für die Überlassung des Themas und
seinen jederzeit gewährten fachmänni-
schen Rat.

Mein Dank gilt auch seinen Mitarbeitern
im Institut und nicht zuletzt Herrn
Prof. Dr. V. Schneider mit seinen Mit-
arbeitern vom Institut für Rechtsmedizin
für ihre Unterstützung.

